

CURRENT BIOCHEMISTRY

ISSN: 2355 - 7877

Journal Homepage: <http://biokimia.ipb.ac.id>Journal Email: current.biochemistry@ipb.ac.id

Pengembangan Nontransgenik F1 dan Bc1f1 Padi Ciherang Toleran Genangan secara *Site-Directed Crossing*

Djarot Sasongko Hami Seno^{1*}, Satya Nugroho², Tri Joko Santoso³, Joel Rivandi Sinaga¹, Euis Marlina¹, Dimas Adrianto¹, Rudi Munzirwan¹, Aniversari Apriana³, Zainal Alim Mas'ud⁴

¹Departemen Biokimia, Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor 16680, Indonesia

²Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong 16911, Indonesia

³Balai Besar Litbang Bioteknologi & Sumber Daya Genetik Pertanian
(BB Biogen), Bogor 16111, Indonesia

⁴Laboratorium Terpadu IPB, Bogor 16144, Indonesia

Received: 1 January 2014; Accepted 25 February 2014

*Corresponding author: Dr. Ir. Djarot Sasongko Hami Seno; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/Fax. +62251-8423267; Email: hamisenodjarot@gmail.com.

ABSTRACT

The development of submergence tolerant rice varieties is urgently required to maintain the stability of future food production, to anticipate the unpredictable global climate changes. Due to in-economical agronomic traits of native submergence tolerant varieties for large scale cultivation, submergence tolerance gene (sub1) must be introduced into popular high-yielding rice variety, such as Ciherang. To develop new submergence tolerant variety with good agronomic traits as those of Ciherang, in this research, submergence tolerance gene (sub1) was introduced into Ciherang variety. To avoid strict GMO regulation, gene introduction was carried out through site-directed crossing. Donor sub1 was crossed with Ciherang host. The selected F1 progenies were further backcrossed to Ciherang 4 x to obtain BC5F1 progeny having ~98% agronomic traits of those of Ciherang. In every cross/backcross generation, submergence test was performed, followed by sub1 marker-assisted PCR. F1 and BC1F1 submergence-tolerant Ciherang were successfully constructed. Co-dominant RM464A marker was not able to discriminate between host, donor, and progenies (F1 and BC1). Co-dominant RM219 maker showed slightly different size between donor and host amplicon, but it was difficult to see their heterozygous progenies. Both C173 and AEX1 dominant markers were able to show sub1 introgression from donor to host. PCR results confirmed that progenies-submergence tolerance was due to sub1 introgression, not escape mechanisms. AEX1 was chosen for subsequent experiments. Backcross until BC5 is in progress, to obtain maximum host retention for engineering new submergence tolerant varieties with good agronomic traits as those of Ciherang.

Keywords: submergence, sub1, dominant/co-dominant marker, AEX1, Ciherang.

ABSTRAK

Pengembangan varietas padi toleran banjir/genangan sangat diperlukan dalam rangka mengupayakan stabilitas pangan dimasa mendatang, sebagai antisipasi perubahan iklim global yang sulit diramalkan. Mengingat karakter agronomi varietas asli toleran genangan kurang ekonomis untuk kultivasi skala besar, gen toleransi genangan perlu diperkenalkan pada varietas populer yang produktivitasnya tinggi, misalnya Ciherang. Dalam rangka pengembangan varietas baru toleran genangan dengan karakter agronomi sebaik varietas Ciherang, pada penelitian ini diperkenalkan gen toleransi genangan (sub1) pada varietas Ciherang. Perkenalkan dilakukan melalui persilangan terarah (site-directed crossing) untuk menghindari produk tanaman transgenik yang pemasarannya terhambat oleh regulasi GMO (Genetically Modified Organisms) yang ketat. Donor sub1 disilangkan dengan host Ciherang. F1 terseleksi di backcross 4 x dengan Ciherang untuk mendapatkan turunan BC5F1. Hal ini ditujukan agar retensi host maksimal sehingga dapat dipertahankan karakter agronomi yang baik dari host Ciherang dan hanya karakter donor yang diinginkan (toleransi genangan) yang terintrogresi. Pada setiap generasi persilangan/backcross dilakukan seleksi uji genangan, diikuti PCR dengan marka toleransi genangan (sub1). F1 dan BC1F1 Ciherang toleran genangan berhasil dikonstruksi. Marka AEX1 didapatkan paling sesuai dibandingkan marka sub1 lain yang dicobakan (marka kodominan RM464A dan RM219, serta marka dominan CI73). AEX1 dapat menunjukkan introgresi sub1 dari donor ke host, mengkonfirmasi toleransi genangan progeni (F1 dan BC1F1) timbul akibat introgresi sub1, bukan karena mekanisme escape. Backcross lebih lanjut sampai BC5F1 masih dalam tahap pelaksanaan.

Kata kunci: toleransi genangan, sub1, marka dominan/kodominan, AEX1, Ciherang.

1. PENDAHULUAN

Pertambahan penduduk semakin tidak sebanding dengan produksi beras yang cenderung stagnan atau bahkan berkurang akibat menyempitnya lahan. Selain itu, terutama di Asia, termasuk Indonesia, sistem irigasi masih belum tertata dan banyak lahan pertanian pada dataran rendah, sehingga rentan terhadap curah hujan berlebih atau luapan air sungai/laut. Perubahan iklim global yang sulit diramalkan juga memberikan kontribusi terhadap meningkatnya frekuensi banjir areal persawahan (Perata and Voisenek 2007). Pengembangan padi toleran banjir/genangan merupakan langkah potensial untuk menjaga stabilitas pangan di masa mendatang.

Umumnya tanaman padi sensitif terhadap genangan (Perata and Voisenek 2007). Pada saat tergenang, padi terekspos dengan berbagai cekaman lingkungan dan biofisik, diantaranya menurunnya intensitas cahaya yang diterima dan hambatan laju difusi gas menuju (O_2 dan CO_2) atau menjauhi (etilen) tanaman (Mohanty *et al.* 2000, Sarkar *et al.* 2006), yang dalam air 10000 lebih lambat dibandingkan di udara (Sarkar *et al.* 2006). Fisika kimia air penggenang juga berpengaruh. Semakin dingin akan semakin menjauhkan enzim dari suhu optimal. Semakin tinggi pH dan semakin kecil kandungan CO_2 semakin menghambat fotosintesis dan mengurangi O_2 untuk respirasi. Semakin keruh akan mengurangi intensitas cahaya, yang bersama dengan kekurangan CO_2 akan

menghambat fotosintesis. Namun kurang relevan kalau dilakukan usaha untuk memanipulasi air banjir dan sulit mengatur intensitas cahaya di alam terbuka. Tinjauan molekuler lebih terfokus pada efek kekurangan O₂ yang menghambat respirasi/sintesis ATP dan akumulasi etilen yang mendorong klorosis serta perpanjangan daun berlebih pada kultivar intoleran (Jackson *et al.* 1987, Jackson and Ram 2003, Ella *et al.* 2003).

FR13A merupakan kultivar toleran genangan yang paling intensif digunakan pada pengembangan padi toleran genangan (Mohanty *et al.* 2000, Jackson and Ram 2003). Toleransi genangan FR13A terkait dengan QTL mayor yang dikenal dengan *submergence (sub1)* (Xu *et al.* 2004), yang terpetakan pada kromosom 9 berukuran 200 kb, dan berperan dalam variasi toleransi genangan kultivar padi toleran indica dan intoleran japonica (Xu and Mackill 1996, Xu *et al.* 2004, Perata and Voesenek 2007). *sub1* FR13A mengkode tiga faktor transkripsi (*sub1A*, *sub1B*, dan *sub1C*) yang termasuk kelompok B-2 subgrup *ethylene response factor (ERFs)/ethylene-responsive element binding proteins (EREBPs) / apetala2 -like proteins (AP2)* (Perata and Voesenek 2007). Regulasi transkripsi *sub1A* dan *sub1C* meningkat akibat genangan, dan peningkatan *sub1C* berkurang dengan adanya *sub1A*, mengindikasikan adanya represi *sub1C* oleh *sub1A*, sedangkan *sub1B* hanya sedikit terpengaruh oleh genangan (Perata and Voesenek 2006, Fukao and Serres 2008).

Data-data fisiologi mengindikasikan bahwa strategi survival terhadap genangan berlangsung melalui represi elongasi sel, peningkatan kapasitas fermentasi, dan konservasi karbohidrat; dimana *sub1A* memainkan peran kunci dalam regulasi

mekanisme tersebut (Perata and Voesenek 2006, Fukao and Serres 2008). Genangan mengakibatkan akumulasi etilen yang kemudian menginduksi transkripsi gen *sub1A*. Protein *SUB1A* yang dihasilkan menghambat gen yang berkaitan dengan elongasi sel (ekspansin A/*expA*) dan katabolisme karbohidrat (α -amilase/*amy3D* dan sukrosa sintase/*sus3*) (Fukao and Serres 2008). Penurunan suplai O₂ pada saat tergenang, berpengaruh pada respirasi sehingga menghambat sintesis ATP (Mohanty *et al.* 2000, Fukao and Serres 2008). Selama kondisi anaerob, jalur respirasi berubah dari oksidasi ke fermentasi, dimana *SUB1A* berperan dalam meningkatkan kapasitas fermentasi melalui induksi gen piruvat dekarboksilase (*pdh*) dan alkohol dehidrogenase (*adh*) (Mohanty *et al.* 2000, Fukao and Serres 2008). Padi yang mengekspresi *sub1A*, laju elongasinya rendah, sehingga pati dan karbohidrat lain yang terkonservasi dapat digunakan untuk mempertahankan perlambatan sintesis ATP melalui fermentasi. Kondisi fermentasi akan membuat glikolisis dapat berlanjut sehingga menghasilkan ATP untuk *survival* (Fukao and Serres 2008). Oleh karena itu, gen-gen *pdh*, *adh*, sinyal transduksi, dan *sub1* menjadi target pada pengembangan padi toleran genangan.

Usaha pengembangan varietas toleransi genangan telah dilakukan baik melalui *conventional* maupun *molecular breeding* (rekayasa genetik). *Pdh* dan *adh* yang terkait dengan metabolisme karbohidrat/induksi jalur fermentasi etanol dianggap sebagai komponen penting bagi padi untuk bertahan terhadap cekaman banjir/anaerobik (Mohanty *et al.* 2000, Sarkar *et al.* 2006). Ketidakmampuan tanaman memproduksi etanol pada cekaman anaerobik akan lebih cepat mati (Perata and Voesenek

2006). Pada pengembangan melalui *molecular breeding* klon cDNA *pdcl* pada promotor CaMV 35 S, aktin1, dan promotor sintetik *anoxia-induced* (pada orientasi *antisense/sense*) diintroduksi pada padi (Mohanty *et al.* 2000). Salah satu konstruksi rekombinan (*actin 1-pdcl, sense*) telah digunakan di IRRI untuk pengembangan padi transgenik dengan kapasitas metabolik tinggi pada kondisi anaerobiosis yang mendukung toleransi genangan (Mohanty *et al.* 2000). Tanaman yang dihasilkan mempunyai aktivitas piruvat dekarboksilase dan produksi etanol yang berkorelasi positif dengan survival tanaman yang terekspos genangan. Introduksi gen *adh* (Dennis *et al.* 2004) maupun *sub1* (Xu *et al.* 2004) secara rakayasa genetik juga telah dilakukan. Namun selain dihasilkan produk transgenik, hubungan hasil yang diperoleh dengan toleransi genangan masih perlu diteliti lebih lanjut (Dennis *et al.* 2000, Xu *et al.* 2004). Gen lain yang diteliti adalah berkaitan dengan faktor transkripsi dan sinyal transduksi, namun hingga kini belum ada laporan yang valid (Fukao and Serres 2008). Hingga saat ini belum ada varietas transgenik toleran genangan yang telah dilepas, kemajuan yang diperoleh lebih banyak diperoleh dari *conventional breeding*.

Varietas baru toleran genangan telah dihasilkan melalui *conventional breeding* (Xu *et al.* 2006, Sarkar *et al.* 2006, *Sub1* Rice News 2007). Namun produktivitasnya relatif kurang tinggi (<6,5 ton/ha). Salah satu penyebabnya adalah introgresi donor tidak terminimalisasi karena masih turunan BC2. Oleh karena itu, pada penelitian ini introgresi donor diminimalisir melalui pembentukan hingga BC5 yang komposisi genom progeni ~98% Ciherang, agar produktivitas varietas hasil pengembangan mendekati Ciherang (~8,5 ton/ha).

Pada analisis/seleksi awal toleransi genangan dapat dilakukan dengan uji genangan (Xu *et al.* 2004, Sarkar *et al.* 2006) atau fluorosensi klorofil (Sarkar *et al.* 2006), namun kedua metoda tersebut tidak memberikan informasi apakah sifat toleransi genangan sampel yang diperiksa diakibatkan oleh perlakuan yang diberikan. Oleh karena itu perlu dianalisis molekuler lebih lanjut, misalnya dengan PCR berbasis marka *sub1* (Xu *et al.* 2004, Septiningsih *et al.* 2009). Pada penelitian ini introduksi toleransi genangan dipandu dengan uji genangan serta PCR dengan marka *sub1* yang tersedia pada saat ini, marka dominan AEX1 dan C173 (Septiningsih *et al.* 2009) atau kodominan RM219 dan RM464A (Xu *et al.* 2004). Marka yang paling sesuai digunakan pada penelitian.

2. METODE

Benih padi (*host* Ciherang, donor *sub1*, kontrol intoleran IR42) diperoleh dari BB Biogen KemTan dan LIPI. Metoda persilangan dan *backcross* mengacu pada Soedyanto *et al.* (1978). Uji toleransi genangan dilakukan dengan merendam sepenuhnya tanaman berusia 4 minggu selama 14 hari (Septiningsih *et al.* 2009). Isolasi DNA dari daun muda tanaman dilakukan sesuai metoda Doyle and Doyle (1990). Konsentrasi dan kemurnian DNA ditentukan secara spektrofotometri pada 260 nm dan 260/280 nm (Sambrook *et al.* 1989). Komposisi campuran dan siklus suhu PCR mengacu pada Septiningsih *et al.* (2009) untuk AEX1 dan C173, serta mengacu pada Xu *et al.* (2004) untuk RM464A dan RM219. Produk PCR diidentifikasi dengan elektroforesis agarosa (1-2%) dengan menyertakan standar

marker DNA, kemudian divisualisasi dengan pewarnaan etidium bromida (10 mg/L) dengan menggunakan sinar UV, kemudian difoto dengan *Biorad Chemidoc gel system* (Sambrook *et al.* 1989, Xu *et al.* 2004, Bradbury *et al.* 2005, Septiningsih *et al.* 2009).

3. HASIL

Seleksi dan Validasi marka *sub1*

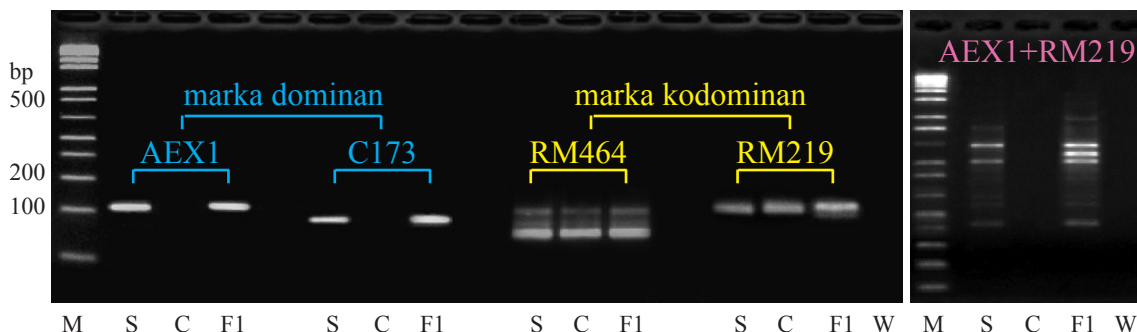
AEX1 dan C173 dapat membedakan sampel *host* Ciherang dan donor toleransi genangan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1. Introgresi *sub1* teridentifikasi dengan adanya pita pada progeni persilangan (F1CA) yang sebelumnya hanya ada pada sampel padi donor, tapi tidak pada padi *host*.

Amplifikasi PCR juga dilakukan menggunakan kombinasi berbagai marka *sub1* (AEX1, C173, RM464, dan RM219). Hasil yang konsisten dan menarik diperoleh pada penggunaan *forward* RM219 dan *reverse* AEX1 (Gambar 1). Pada sampel donor teramplifikasi ampikon yang tidak ada pada sampel Ciherang. Pita tersebut juga muncul pada progeni persilangan F1, disertai ampikon tambahan yang tidak terdapat pada donor.

Ampikon tambahan yang tidak terdapat pada donor diduga introgresi *sub1* dari donor ke *host* Ciherang dan rekombinasinya menghasilkan pita tambahan tersebut. Elusidasi lebih lanjut sedang dalam pelaksanaan, terutama terkait dengan kemungkinan untuk konstruksi marka *sub1* baru.

Contoh hasil pembentukan dan seleksi F1 Ciherang-toleran genangan (F1CS)

Outline dan contoh hasil pembentukan dan F1 CS disajikan pada Gambar 2. *Host* Ciherang dan donor *sub1* disilangkan kemudian dilanjutkan penanamannya sampai panen. Biji F1 CS, bersama dengan Ciherang, tetua donor *sub1*, dan kontrol negatif IR42 ditanam pada cawan petri, dipindahkan ke pot uji genangan (2 minggu), kemudian diuji genangan selama 2 minggu. Tanaman yang dapat bertahan hidup setelah uji genangan dan *recovery*, kemudian dipindahkan ke dalam pot/ember. Sekitar 2 minggu - 1 bulan, dilakukan isolasi DNA dari sampel daun muda tanaman, diamplifikasi PCR dengan marka *sub1* AEX1, dilanjutkan dengan elektroforesis produk PCR, visualisasi gel serta dokumentasi menggunakan *gel doc*.



Gambar 1 Hasil validasi berbagai marka toleransi genangan (*sub1*).

(M = size marker. S, C, dan F1 menunjukkan sampel donor *sub1*, *host* Ciherang, dan F1 Ciherang-*sub1*. AEX1 dan C173 merupakan marka *sub1* dominan, sedangkan RM464A dan RM219 merupakan marka *sub1* kodominan. W = air (kontrol negatif))



Gambar 2 Outline dan contoh hasil pembentukan dan seleksi F1 CS.

(Ket : 1–4 = contoh tanaman Ciherang, donor *sub1*, persilangan, dan malai. 5–7 = contoh biji/buah F1, tanaman F1 pada cawan petri, dan pot kecil untuk uji genangan. 8 = uji toleransi genangan. 9–10 = tanaman F1 yang positif setelah uji genangan di pot/ember pada awal penanaman, dan pada saat pengambilan sampel daun untuk isolasi DNA. 11 = contoh gel agarosa hasil elektroforesis produk PCR; M = *size marker*, S = donor toleran genangan/*sub1*, C = Ciherang, F1 = F1 CS (Ciherang-*sub1*), dan W = air. 12 = Tanaman F1 CS yang akan *backcross* lebih lanjut dengan Ciherang untuk mendapatkan BC1F1 CS. Panah menunjukkan urutan tahap percobaan. Ukuran pita seperti pada Gambar 1).

Hasil yang diperoleh (Gambar 2.11) menunjukkan tanaman F1CS yang telah melewati uji genangan mengandung pita *sub1* yang tadinya tidak ada pada Ciherang dan hanya ada pada donor *sub1*.

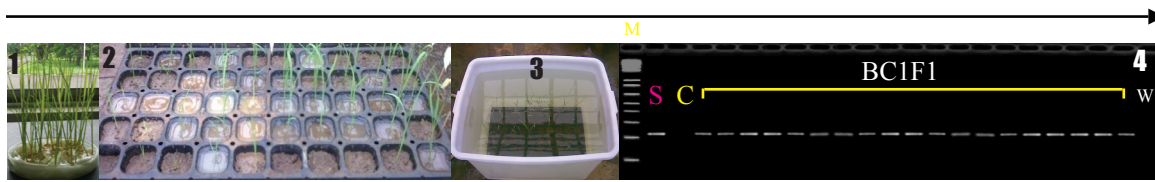
Uji genangan dan analisis PCR BC1F1 Ciherang toleran genangan (BC1F1 CS)

F1 terseleksi pada tahap di atas disilang balik dengan *host* Ciherang, kemudian dilakukan rangkaian perlakuan seperti pada F1CS. Keberhasilan pembentukan BC1F1 CS terlihat dari adanya pita *sub1* hasil PCR sampel BC1F1CS (Gambar 3).

4. PEMBAHASAN

Pada saat ini telah tersedia marka toleransi genangan kodominan (RM464A, RM219) (Xu *et al.* 2004) dan dominan (C173, AEX1) (Septiningsih *et al.* 2009). Namun demikian, marka-marka tersebut perlu divalidasi dan dipilih yang terbaik/sesuai untuk penelitian ini. Hasil validasi yang ditunjukkan pada Gambar 1 sesuai dengan publikasi sebelumnya yang menyatakan bahwa AEX1 dan C173 dapat membedakan sampel *host* Ciherang dan donor toleransi genangan.

Introgressi *sub1* teridentifikasi dengan adanya pita pada progeni persilangan (F1CA) yang sebelumnya hanya ada pada sampel padi



Gambar 3 Contoh hasil uji genangan dan analisis PCR BC1F1 CS. (Ket : 1 – 3 = contoh tanaman pada petri, pot uji genangan, dan pada saat digenangi (14 hari). 4 = contoh hasil elektroforesis ampikon PCR. M = size marker, S = donor *sub1*, C = Ciherang, BC1F1= (Ciherang-*sub1*), w = air (kontrol negatif). Panah menunjukkan urutan tahap percobaan. Outline percobaan dilakukan seperti pada Gambar 2. Ukuran pita seperti pada Gambar 1).

donor tapi tidak pada padi *host*. Sementara marka kodominan RM464A tidak dapat membedakan sampel donor dengan *host*, sesuai dengan publikasi sebelumnya yang menyatakan marka ini lebih sesuai untuk varietas padi Indica (Xu *et al.* 2004). Walaupun marka kodominan RM219 dapat membedakan sampel donor dari sampel *host*, namun perbedaan ukuran pitanya terlalu kecil (~5 bp) sehingga pada sampel heterozigot hasil persilangan (F1) sulit dideteksi dan menyulitkan di lapangan. Penggunaan gel poliakrilamid juga telah direkomendasikan (Xu *et al.* 2004, Septiningsih *et al.* 2009, Shi *et al.* 2008), namun hal tersebut akan menyebabkan metode seleksi menjadi kurang praktis, mengingat banyaknya jumlah sampel yang dianalisis pada penelitian ini. Marka dominan lebih praktis untuk penelitian ini. AEX1 lebih dipilih daripada C173 karena ukuran ampikon yang lebih besar sehingga memudahkan analisis hasil percobaan.

Konsistensi marka AEX1 dalam membedakan sampel padi *host* Ciherang dan hasil persilangan (F1 CS) maupun *backcross* (BC1F1 CS) ditunjukkan pada Gambar 3. F1 CS dan BC1F1 CS telah terseleksi melalui uji genangan sehingga merupakan varietas Ciherang yang toleran genangan. Seleksi PCR berbantuan marka *sub1* merupakan konfirmasi

berlangsungnya introgresi *sub1* dari donor ke *host*, ditunjukkan dengan adanya pita *sub1* pada hasil PCR sampel-sampel F1 CS dan BC1F1 CS (Gambar 3). Karena telah melewati seleksi uji genangan, semua sampel F1 CS maupun BC1F1 CS yang diuji memberikan hasil PCR yang positif. Hasil-hasil yang diperoleh juga mengkonfirmasi bahwa sifat toleransi genangan F1 CS dan BC1F1 CS disebabkan karena terintrogresinya gen *sub1* dari donor, bukan karena mekanisme *escape*, sebagaimana dilaporkan oleh peneliti lain menggunakan varietas yang berbeda (Xu *et al.* 2004, Septiningsih *et al.* 2009)

Walaupun F1 CS dan BC1F1 CS yang telah diperoleh merupakan varietas Ciherang yang toleran genangan, namun karakter agronominya masih 50% (F1) dan 75 % (BC1F1) dari karakter padi Ciherang, atau belum sebaik Ciherang. Seperti halnya varietas toleran genangan hasil rekayasa yang ada pada saat ini (Tabel 1), terjadi penurunan kualitas *host* karena umumnya merupakan turunan BC2 (Xu *et al.* 2004, Sarkar *et al.* 2006, *Sub1* Rice News 2007) sehingga introgresi donor belum diminimalisir. Penelitian ini akan dilanjutkan untuk mendapatkan BC5F1 Ciherang-*sub1*, yang merupakan varietas toleran genangan dengan karakter ~98% Ciherang.

Tabel 1 Varietas padi toleran genangan hasil rekayasa (Xu *et al.* 2004, Sarkar *et al.* 2006, *Sub1* Rice News 2007)

Varietas	Lama berbunga (hari)	Lama matang (hari)	Tinggi (cm)	Produktivitas (ton/ha)
IR64- <i>Sub1</i> (IR07F102)	86	116	95	5,9
Swarna- <i>Sub1</i> (IR05F102)	104	134	85	5,3
Samba Mahsuri- <i>Sub1</i> (IR07F101)	98	126	85	6,5
TDK 1- <i>Sub1</i> (IR07F289)	Sedang dikarakterisasi di IRRI			
BR11- <i>Sub1</i> (IR07F290)				
CR1009- <i>Sub1</i> (IR07F291)				
PSB RC68	98	121	121	6,5
IR49830-7-1-2-3	100	130	110	

Metoda uji genangan dapat dilakukan terhadap tanaman sampel yang berusia 1 bulan pada pot uji genangan secara bersamaan (Septiningsih *et al.* 2009) atau terhadap tanaman yang umurnya lebih tua (2 bulan) pada pot kecil secara terpisah (Xu *et al.* 2004, Fukao and Serres 2008). Uji genangan pada penelitian ini menggunakan metoda Septiningsih *et al.* (2009) karena relatif lebih baik mengingat semakin muda tanaman semakin sensitif (lebih mudah mati) sehingga toleransi tanaman dapat lebih diandalkan. Selain itu pengujian pada pot secara bersamaan lebih memastikan homogenitas kondisi tanah sehingga dapat dihindari variasi lingkungan/tanah antar sampel. Jumlah sampel yang banyak (400-600 tanaman tiap generasi persilangan atau *backcross*) juga membuat metoda ini lebih praktis di lapangan, serta lebih memungkinkan keseragaman perlakuan pada semua sampel.

Kecilnya ukuran InDel (~5 bp) telah menjadi kendala utama pada konstruksi marka kodominan toleransi genangan, seperti pada marka RM219 (Xu *et al.* 2004). Masalah ini relatif teratasi terkait dengan toleransi genangan yang merupakan karakter dominan, sehingga masih dapat digunakan marka dominan seperti

AEX1 dan C173 (Septiningsih *et al.* 2009). Namun pada karakter resesif (misalnya aroma, dsb.), marka kodominan merupakan keharusan, dan kecilnya InDel (4, 7, atau 8 bp) menjadi kendala pada aplikasi marka aromatik (Shi *et al.* 2008, Amarawathi *et al.* 2008, Sakthivel *et al.* 2009), dan marka karakter padi yang lain.

Oleh karena itu untuk pengembangan varietas padi unggul dimasa mendatang, perlu dikembangkan metoda lain yang lebih tegas dari elektroforesis untuk mendeteksi sampel padi heterozygot dengan perbedaan InDel sekuen DNA yang relatif kecil. Kit berbasis *nano-molecular beacon* (Wang *et al.* 2008), merupakan salah satu alternatif yang menjanjikan. Metoda ini akan lebih tegas, mudah, dan cepat. Selain itu diperkirakan jauh lebih murah karena tidak diperlukan peralatan PCR dan elektroforesis, beserta reagen-reagennya yang relatif mahal.

Varietas toleran genangan yang diperoleh pada penelitian ini masih merupakan varietas adaptif terhadap perubahan iklim secara parsial. Varietas yang secara penuh adaptif terhadap perubahan iklim harus toleran terhadap cekaman abiotik (genangan, kekeringan, salinitas tinggi). Walaupun dengan pengaturan kebijakan dapat diatur agar varietas toleran genangan

diperuntukkan pada lahan pertanian di dataran rendah dan varietas toleran kekeringan pada dataran tinggi, namun cuaca ekstrem serta anomali cuaca belakangan ini sering terjadi. Banjir bisa terjadi pada dataran tinggi dan kekeringan bisa terjadi pada dataran rendah. Lahan pertanian di Pulau Jawa umumnya terlokasi di sepanjang Pantura, sehingga bisa jadi banjir disebabkan oleh interupsi air laut. Pada kasus seperti ini, maupun pada daerah-daerah yang pernah terkena bencana Tsunami (Aceh), seyogyanya toleransi genangan juga disertai toleransi salinitas tinggi. Namun mekanisme molekuler toleransi salinitas tinggi lebih dekat dengan toleransi kekeringan karena terkait mekanisme osmosis (Xiao *et al.* 2007, ACPFG 2008, Xeng *et al.* 2009). Introduksi toleransi salinitas tinggi dapat dilakukan secara bersamaan dengan toleransi kekeringan. Varietas tersebut kemudian bisa disilangkan dengan varietas toleransi genangan yang menjadi target penelitian ini, untuk mendapatkan target jangka panjang : "Rekayasa padi berkualitas (aromatik, produktivitas tinggi ~8 ton/ha, nontransgenik) dan adaptif terhadap perubahan iklim (toleran cekaman abiotik : genangan, kekeringan, salinitas tinggi) secara *site-directed crossing*". Introgresi toleran genangan didahulukan pada penelitian ini karena mencakup area yang paling luas, mengingat Indonesia, seperti pada umumnya negara dengan sistem pertanian tadah hujan, irigasi pertanian belum tertata sehingga secara kultural nenek moyang bangsa Indonesia memilih dataran rendah untuk lahan pertanian sehingga memudahkan irigasi, dan dataran tinggi dianggap kurang produktif, umumnya dijadikan makam.

Berdasarkan penelitian ini, F1 dan BC1F1 Ciherang toleran genangan telah berhasil

dikonstruksi secara *site-directed crossing* dengan bantuan uji genangan serta PCR menggunakan marka *sub1* dominan AEX1. AEX1 paling ideal dari marka *sub1A* yang dicobakan dan dapat mendeteksi introgresi gen *sub1* dari padi donor toleran genangan pada progeni persilangan (F1 dan BC1F1 CS), dan akan digunakan untuk percobaan-percobaan *backcross* selanjutnya hingga BC5.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis beserta tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi, atas dana yang telah diberikan (Nomor Kontrak : 021 /RT /D.PS1PTN /Insentif /PPK /I /2010, Tanggal : 15 Januari 2010) sehingga penelitian ini dapat berlangsung. Selain itu juga kepada LPPM IPB, FMIPA IPB, Departemen Biokimia IPB, LT IPB, BB Biogen, dan LIPI atas kerjasama, pengelolaan administrasi, dukungan serta fasilitas SDM dan laboratorium.

6. DAFTAR PUSTAKA

- ACPFG (Australian Centre for Plant Functional Genomics). 2008. Annual report. Australian Centre for Plant Functional Genomics Pty. Ltd., pp: 15-17; 23-25.
- Bradbury LM, Fitzgerald TL, Henry RJ, Jin Q, Waters DLE. 2005a. The gene for fragrance in rice. *Plant Biotech J* 3:363-370.
- Bradbury LMT, Henry RJ, Jin Q, Reinke RF, Waters DLE. 2005b. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Mol Breed* 16:279-283.
- Ella ES, Kawano N, Yamauchi Y, Tanaka K, Ismail AM. 2000. Blocking ethylene perception enhances flooding tolerance of rice. *Indian J. Plant Physiol.* 30: 813-819.
- Fukao T, Serres J. 2008. Submergence tolerance conferred by *Sub1A* is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *PNAS*. 105: 16814-19

- Gong Z, Chinnusamy V, Zhu J-K. 2008. The Molecular networks of abiotic stress signalling, *Ann. Plant Rev.* 33: 388-416
- Herd RW. 1991. Research priorities for rice biotechnology, dalam Khus GS dan Toenniessen GH (ed), *Rice Biotechnology*, IRRI, CAB International, Wallingford, UK
- Jackson MB dan Ram PC (2003) Physiological and molecular basis of susceptibility and tolerance of rice plants to complete submergence. *Ann. Bot.* 91: 227-41.
- Jackson MB, Waters L, Setter TL, Greenway H (1987) Injury to rice plants caused by complete submergence: a contribution by ethylene (ethene). *J. Exp. Bot.* 38: 1826-38.
- Lang NT dan Bu BC (2008) Development of PCR-based markers for aroma (*mgr*) gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Omonrice* 16: 16-23
- Lu J J. and Chang T T. 1980. *Rice in Temporal and Spatial Prospective*. In Rice Production and Utilization. Bor s. Luh (ed). West Port: AVI Pb.
- Mackill DJ, Septiningsih E, Pamploma AM, Sanches D, Iftekhar A, Masudussaman AS, Collard B, Neeraja C, Vergara G, Maghirang-Rodriguez, R, Heuer S, Ismail AM (2007) Marker assisted selection for submergence tolerance in rice. *Mol. Plant Breeding* 5: 207-208.
- Mohanty HK, Mallik S, Grover A (2000) Prospect of improving flooding tolerance in lowland rice varieties by conventional breeding and genetic engineering. *Curr. Sci.* 78: 132-140.
- Perata P, Voisenek LACJ (2006) Submergence tolerance in rice requires *Sub1A*, an ethylene-response-factor-like gene. *Trends in Plant Sci.* 12: 43-46.
- Redona ED, Mackill DJ (1996) Mapping quantitative trait loci for seedling vigor in rice using RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 92: 395-402.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed., Books:1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sarkar RK, Reddy JN, Sharma SG, Ismail AM (2006) Physiology basis of submergence in rice and implications for crop protection. *Curr. Sci.* 91: 899-906.
- Sakthivel K, Rani NS, Pandey MK, Sivaranjani AKP, Neeraja CN, Balachandran SM, Madhav MS, Viraktamath BC, Prasad SV, and Sundaram RM (2009) Development of a simple functional marker for fragrance in rice and its validation in Indian Basmati and non-Basmati fragrant rice varieties. *Mol. Breeding* DOI 10.1007/s11032-009-9283-x
- Septiningsih EM, Alvaro M. Pamplona, Darlene L. Sanchez, Chirravuri N. Neeraja, Georgina V. Vergara, Sigrid Heuer, Abdelbagi M. Ismail and David J. Mackill. 2009. Development of submergence-tolerant rice cultivars: the *Sub1* locus dan beyond. *Annals of Botany* 103:151-160.
- Shi W, Yang Y, Chen S, Xu M (2008) Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. *Mol. Breeding* 22: 185-192.
- Sub1* Rice News (2007) IRRI-Japan project on submergence-tolerant rice varieties. Vol 1 October-December.
- Thach TD (1999) A deepwater tolerant gene detected in the common wild rice. *Omonrice*. 7: 174-6.
- Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L (2007) Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions, *Theor. Appl. Genet.* 115: 35-46.
- Xu K, Deb R, Mackill DJ (2004) A microsatellite Marker and a Codominant PCR-Based Marker for Marker-assisted selection of Submergence Tolerance in Rice. *Crop Sci.* 44:248-253.
- Zheng X, Chen B, Lu G, Han B (2009) Over-expression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379: 985-989